

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-537143

(P2020-537143A)

(43) 公表日 令和2年12月17日(2020.12.17)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 35/10 (2006.01)	GO 1 N 35/10	C 2 G 0 5 8
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/00	A 4 B 0 2 9

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 26 頁)

(21) 出願番号	特願2020-520552 (P2020-520552)	(71) 出願人	591003013 エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー F. HOFFMANN-LA ROCH E AKTIENGESELLSCHAFT スイス・シーエイチ-4070バーゼル・ グレンツアーヘルストラツセ124
(86) (22) 出願日	平成30年10月9日 (2018.10.9)	(74) 代理人	100118902 弁理士 山本 修
(85) 翻訳文提出日	令和2年5月20日 (2020.5.20)	(74) 代理人	100106208 弁理士 宮前 徹
(86) 国際出願番号	PCT/EP2018/077376	(74) 代理人	100120112 弁理士 中西 基晴
(87) 国際公開番号	W02019/072784	(74) 代理人	100157923 弁理士 鶴喰 寿孝
(87) 国際公開日	平成31年4月18日 (2019.4.18)		
(31) 優先権主張番号	17195977.8		
(32) 優先日	平成29年10月11日 (2017.10.11)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)		

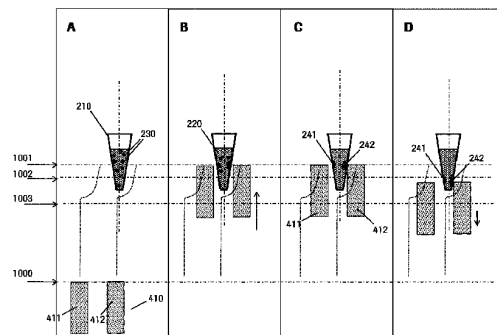
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 磁気粒子を用いて生物学的試料をプロセッシングするための方法

(57) 【要約】

本開示は、磁気粒子を用いて、マルチウェルプレートにおいて、液体試料から生物学的ターゲット物質を単離するための方法であって、マルチウェルおよび磁気分離プレートの互いに対する特定の移動によって高い効率および低い溶出体積が達成される前記方法に関する。やはり開示するのは、該方法を実行するために適したプレ分析系である。

Fig. 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

液体試料から生物学的ターゲット物質を単離するための方法であって：

a．開放頂部および閉鎖底部を持つ複数のウェル（210）を有するマルチウェルプレート（200）を提供し、ここで、複数のウェル（210）の少なくとも一部は、第一の液体体積において、液体試料（220）および結合表面を持つ磁気粒子（230）の懸濁物を含み、マルチウェルプレート（200）は磁気分離プレート（400）の複数の磁石（410）のあらかじめ決定された幾何学的配置に対応する位置で凹部（205）をさらに含む；

b．磁気分離プレート（400）の磁石（410）が磁気粒子（230）を移動させるために十分な強度でマルチウェルプレート（200）のウェル（210）内に磁場勾配を引き起こさないように、互いに十分な距離である、マルチウェルプレート（200）および磁気分離プレート（400）のインキュベーション位置（1001）において、磁気粒子（230）の表面に生物学的ターゲット物質が結合する条件を用いて、液体試料（220）および磁気粒子（230）をインキュベーションし；

c．上部周辺収集位置（1002）に到達するように、マルチウェルプレートの凹部（205）内に、磁気分離プレート（400）の磁石（410）を導入し、ここで、各磁石（410）は、ウェルの内部空間に磁場勾配を課すように、対応するウェル（210）の外壁に十分に近接しており、それによって、第一の特定の高度で、それぞれのウェル（210）の内壁に磁気粒子（230）のペレット（240）を形成する；

d．下部周辺収集位置（1003）に到達するように、マルチウェルプレート（200）および/または磁気分離プレート（400）を互いに対して相対的に移動させて、ここで、移動は、ペレット（240）が、磁場勾配によって、第二の特定の高度に到達するように、それぞれのウェル（210）の頂部から底部への方向で、内壁に沿って移動するように、垂直および側方方式で行われる；

e．ピペッターの複数のピペットチップ（260）をマルチウェルプレート（200）のウェル（210）内に、そしてピペットチップ（260）で液体の可能な最大量を抜き取るために、ウェル（210）の底部に十分に近接して下方に導入し、ここで、ペレット（240）およびピペットチップ（260）の側方位置は、ペレット（240）を乱すために十分な互いの間の物理的相互作用を回避するため、磁気粒子（230）のペレット（240）およびピペットチップ（260）に関して十分に間隔が空いている；

f．磁力によって、磁気粒子（230）のペレット（240）を保持しながら、それぞれのウェル（210）から液体を抜き取り；

g．随意に、生物学的ターゲット物質を磁気粒子上に保持しながら、磁気粒子（230）の表面から望ましくない構成要素を除去するため、洗浄緩衝液（300）をウェル（210）に添加し、次いで、磁力によって、磁気粒子（230）のペレット（240）を保持しながら、それぞれのウェル（210）から液体を抜き取り；

h．マルチウェルプレート（200）の凹部（205）から、マルチウェルプレート（200）および磁気分離プレート（400）のインキュベーション位置に、磁気分離プレート（400）の磁石（410）を回収し、そしてウェル（210）に溶出緩衝液（430）を添加して、第二の液体体積を生じ、ここで、第二の液体体積は第一の液体体積より少ない、そしてその中で磁気粒子（230）を再懸濁し；

i．溶出緩衝液（430）で、磁気粒子（230）から生物学的ターゲット物質を溶出させ；

j．磁気分離プレート（400）の磁石（410）を、上部（1002）または下部周辺収集位置（1003）に到達するように、マルチウェルプレート（200）の凹部（205）内に導入し、ここで、各磁石（410）は、ウェルの内部空間に磁場勾配を課すように、対応するウェル（210）の外壁に十分に近接しており、それによって、第一または第二の特定の高度で、それぞれのウェル（210）の内壁に磁気粒子（230）のペレット（240）を形成する；

10

20

30

40

50

k. ピペッターの複数のピペットチップ(260)をマルチウェルプレート(200)のウェル(210)内に、そしてピペットチップ(260)で液体の可能な最大量を抜き取るために、ウェル(210)の底部に十分に近接して下方に導入し、ここで、ペレット(240)およびピペットチップ(260)の側方位置は、ペレット(240)を乱すために十分な互いの間の物理的相互作用を回避するため、ペレット(240)およびピペットチップ(260)に関して十分に間隔が空いている；

1. 磁力によって、磁気粒子(230)のペレット(240)を保持しながら、それぞれのウェル(210)から、単離された生物学的ターゲット物質を含有する溶出液を抜き取る

工程を含む、前記方法。

10

【請求項2】

工程c. で複数のペレット(241、242)が形成され、そして工程d. が複数のペレット(241、242)をプールするための以下の

I. 中央収集位置(1000)に到達するように、マルチウェルプレート(200)および/または磁気分離プレート(400)を互いに対して相対的に移動させて、ここで、移動は、ペレット(241、242)が、磁場勾配によって、それぞれのウェル(210)の頂部から底部への方向で、内壁に沿って移動して、ウェル底部でプールされて、単一のペレット(240)を形成するように、垂直および側方方式で行われる；

II. 下部周辺収集位置(1003)に到達するように、マルチウェルプレート(200)および/または磁気分離プレート(400)を互いに対して相対的に移動させる、ここで、移動は、ペレット(241、242)が、磁場勾配によって、第二の特定の高さに到達するように、それぞれのウェル(210)の底部から頂部への方向で、内壁に沿って移動するように、垂直および側方方式で行われる；

20

下位工程からなる、請求項1の方法。

【請求項3】

工程d. を、工程g. および/または工程j. に続いて反復する、請求項2の方法。

【請求項4】

磁気粒子(230)が50nm~50μmの平均直径を有する、先行する請求項いずれかの方法。

【請求項5】

磁気粒子(230)が超常磁性である、先行する請求項いずれかの方法。

30

【請求項6】

工程h. の溶出体積が5μl~50μlである、先行する請求項いずれかの方法。

【請求項7】

互いに対して相対的なマルチウェルプレート(200)および/または磁気分離プレート(400)の側方移動が、水平軸に沿って次元である、先行する請求項いずれかの方法。

【請求項8】

互いに対して相対的なマルチウェルプレート(200)および/または磁気分離プレート(400)の垂直および側方移動が、ガイドレール(541、542)を有するガイドスクリーン(540)によって導かれ、ガイドスクリーン(540)がマルチウェルプレート(200)および/または磁気分離プレート(400)に対して本質的に垂直である、先行する請求項いずれかの方法。

40

【請求項9】

液体試料(220)から生物学的ターゲット物質を単離するためのプレ分析系であって

：

- 開放頂部および閉鎖底部を持つ複数のウェル(210)を有するマルチウェルプレート(200)、ここで、複数のウェル(210)の少なくとも一部が、第一の液体体積において、液体試料(220)および結合表面を持つ磁気粒子(230)の懸濁物を含み、マルチウェルプレート(200)が磁気分離プレート(400)の複数の磁石(410)

50

のあらかじめ決定された幾何学的配置に対応する位置で凹部（２０５）をさらに含む；

- ガイドスクリーン（５４０）および磁気分離プレート（４００）を含む磁気分離デバイス（５００）、ここで、ガイドスクリーン（５４０）がマルチウェルプレート（２００）および／または磁気分離プレート（４００）に対して本質的に垂直であり、そしてマルチウェルプレート（２００）および／または磁気分離プレート（４００）の互いに対して相対的な移動を導くためのガイドレール（５４１、５４２）を有し、磁場勾配によって、磁気粒子（２３０）のペレット（２４０）がマルチウェルプレート（２００）のウェル（２１０）の内壁に沿って移動するように、移動が垂直および側方方式で行われるの要素を含む、前記プレ分析系。

【請求項１０】

マルチウェルプレート（２００）が標準ＳＢＳ形式にしたがった寸法を有する、請求項９のプレ分析系。

【請求項１１】

磁気分離デバイス（５００）が、その上面に、マルチウェルプレート（２００）を受け入れるためのフレーム（５６０）をさらに含む、請求項９または１０いずれかのプレ分析系。

【請求項１２】

ガイドスクリーン（５４０）が、磁気分離デバイス（５００）のフレーム（５６０）に物理的に連結されている、請求項１１のプレ分析系。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、生物学的または生化学的アッセイを実行するための分析系の分野に属する。この分野内で、これは、液体生物学的試料、例えば生体分子を含有する試料を、プレ分析系で使用される磁気粒子の補助で、プロセッシングすることに関する。

【発明の概要】

【０００２】

分析適用における、臨床試料などの生物学的試料のプロセッシングは、特に臨床診断の分野において、しばしば、磁気マイクロまたはナノ粒子の使用を伴う。磁気粒子、例えば結合粒子の補助で単離されたターゲット分子に関する下流分析法は、例えば、RNA、DNA、mRNAなどの核酸の増幅、検出および／または配列決定（PCRまたは他の増幅技術による）、タンパク質に関する質量分析、ELISAあるいは電気または化学発光アッセイ等である。

【０００３】

典型的には、磁気粒子は、適切な条件を用いて、生物学的ターゲット物質が結合しうる表面を提示する。非磁気結合粒子とは対照的に、これらは、生物学的ターゲット物質に関する単離プロセス中、それぞれの上清を取り除いた際に、磁石によって保持可能であり、したがって遠心分離または匹敵する技術の必要性を撤廃することが可能である。

【０００４】

磁気粒子に基づく試料調製技術は、当該技術分野に周知であり、そして自動化が容易であることならびに他の利点に関して評価されている。

しかし、質量分析および核酸配列決定を含む特定の分析または診断技術によって必要とされるように、少ない体積でプロセスを実行し、そして少ない溶出体積を得ることは困難であると立証されてきている。前記技術はしばしば、問題の分析物を高濃度で必要とするが、これは、特に、生物学的ターゲット物質が、多くの場合、臨床試料などの試料においては豊富に入手可能ではないか、または試料自体の入手可能性が限定されている可能性もあるため、大きな溶出体積では達成が困難であろう。

【０００５】

したがって、磁気粒子のプロセッシングにおいて、高い効率を達成することが重要である。特に、失われた粒子はすべて、得られるはずの生物学的物質の貴重な部分の損失を意味

10

20

30

40

50

するため、試料調製または分析物単離プロセス全体での磁気粒子の損失を最小限にすべきである。さらに、溶出液中に見られる磁気粒子は、下流プロセスを妨害しうる。

【0006】

磁気粒子の損失は、多様な要因によって引き起こされうる。例えば、Wittら(2012, Forensic Science International: Genetics, Issue 6, pp. 539-547)は、プロセスの経過において、より効率的に回収できるように、サイズが増加した粒子の使用を示唆する。しかし、こうしたビーズは、容器の底に沈む傾向をより強く示すため、特に結合プロセス中にこれらを再懸濁する必要がある。さらに、こうしたビーズは結合能がかなりより低く、そして集団の粒子間のポイド容量が大きい可能性があり、ビーズから液体を完全に取り除くことを困難にする可能性がある。

10

【0007】

当該技術分野におけるさらなる困難は、信頼性を持って、付き添いなしに、そして完全に自動化されたプロセスを実行するとともに、いくつかの試料を並行してプロセッシングすることであった。

【0008】

本開示は、当該技術分野においてこうした欠点を回避するアプローチを記載する。

概要

本明細書に記載する第一の側面において、磁気粒子の懸濁物を含む液体試料を保持するマルチウェルプレートの提供で始まる、液体試料から生物学的ターゲット物質を単離するための方法を記載する。生物学的物質が粒子に結合する条件下で試料をインキュベーションし、そして続いて磁気分離プレートの磁石を、マルチウェルプレートの対応する凹部に導入し、こうして磁場勾配を発動して、それぞれのウェルの内部側壁で磁気粒子のペレットを形成する。次いで、多数のピペットチップをウェルの底に下げて導入し、壁に保持されたペレットを乱すことなく、液体試料を抜き取る。随意の洗浄工程後、マルチウェルプレートの凹部から磁石を回収し、そして溶出緩衝液をウェルに添加する。溶出体積は、各ウェル中の問題の液体試料の最初の体積よりも少ない。適切な条件下で所望の生物学的物質を溶出した後、磁石をプレート凹部に再導入し、そして磁気勾配によって、ウェルの内部側壁の特定の高さで磁気粒子のペレットを保持しながら、ピペットチップを用いることによって、ウェルの底部から溶出液を抜き取る。結合、洗浄および溶出の工程の少なくとも1つの後、ペレットが、磁場勾配によって、それぞれのウェルの頂部から底部への方向で、内壁に沿って移動するように、垂直および側方方式で、マルチウェルプレートおよび/または磁気分離プレートを互いに対して相対的に移動させることによって、磁気粒子のペレットを収集する。

20

30

【0009】

本明細書にやはり開示するのは、上記方法を実行するための系である。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】図1は、本明細書記載の方法のインキュベーション工程の模式的側面図を示す。

【図2】図2は、本明細書記載の方法の随意の洗浄工程を模式的に示す。

40

【図3】図3は、磁気粒子から分析物を溶出するための本明細書記載の方法の工程を特徴づける。

【図4】図4は、マルチウェルプレートおよび磁気分離デバイスを含むプレ分析系の透視図を提供する。

【発明を実施するための形態】

【0011】

本明細書に記載する第一の側面は、液体試料から生物学的ターゲット物質を単離するための方法であって：

a. 開放頂部および閉鎖底部を持つ複数のウェルを有するマルチウェルプレートを提供し、ここで、複数のウェルの少なくとも一部は、第一の液体体積において、液体試料およ

50

び結合表面を持つ磁気粒子の懸濁物を含み、マルチウェルプレートは磁気分離プレートの複数の磁石のあらかじめ決定された幾何学的配置に対応する位置で凹部をさらに含む；

b．磁気分離プレートの磁石が磁気粒子を移動させるために十分な強度でマルチウェルプレートのウェル内に磁場勾配を引き起こさないように、互いに十分な距離である、マルチウェルプレートおよび磁気分離プレートのインキュベーション位置において、磁気粒子の表面に生物学的ターゲット物質が結合する条件を用いて、液体試料および磁気粒子をインキュベーションし；

c．上部周辺収集位置に到達するように、マルチウェルプレートの凹部内に、磁気分離プレートの磁石を導入し、ここで、各磁石は、ウェルの内部空間に磁場勾配を課すように、対応するウェルの外壁に十分に近接しており、それによって、第一の特定の高さで、それぞれのウェルの内壁に磁気粒子のペレットを形成する；

d．下部周辺収集位置に到達するように、マルチウェルプレートおよび/または磁気分離プレートを互いに対して相対的に移動させて、ここで、移動は、ペレットが、磁場勾配によって、それぞれのウェルの頂部から底部への方向で、内壁に沿って移動して、第二の特定の高さには到達するように、垂直および側方方式で行われる；

e．ピペッターの複数のピペットチップをマルチウェルプレートのウェル内に、そしてピペットチップで液体の可能な最大量を抜き取るために、ウェルの底部に十分に近接して下方に導入し、ここで、ペレットおよびピペットチップの側方位置は、ペレットを乱すために十分な互いの間の物理的相互作用を回避するため、磁気粒子のペレットおよびピペットチップに関して十分に間隔が空いている；

f．磁力によって、磁気粒子のペレットを保持しながら、それぞれのウェルから液体を抜き取り；

g．随意に、生物学的ターゲット物質を磁気粒子上に保持しながら、磁気粒子の表面から望ましくない構成要素を除去するため、洗浄緩衝液をウェルに添加し、次いで、磁力によって、磁気粒子のペレットを保持しながら、それぞれのウェルから液体を抜き取り；

h．マルチウェルプレートの凹部から、マルチウェルプレートおよび磁気分離プレートのインキュベーション位置に、磁気分離プレートの磁石を回収し、そしてウェルに溶出緩衝液を添加して、第二の液体体積を生じ、ここで、第二の液体体積は第一の液体体積より少ない、そしてその中で磁気粒子を再懸濁し；

i．溶出緩衝液で、磁気粒子から生物学的ターゲット物質を溶出させ；

j．磁気分離プレートの磁石を、上部または下部周辺収集位置に到達するように、マルチウェルプレートの凹部内に導入し、ここで、各磁石は、ウェルの内部空間に磁場勾配を課すように、対応するウェルの外壁に十分に近接しており、それによって、第一または第二の特定の高さで、それぞれのウェルの内壁に磁気粒子のペレットを形成する；

k．ピペッターの複数のピペットチップをマルチウェルプレートのウェル内に、そしてピペットチップで液体の可能な最大量を抜き取るために、ウェルの底部に十分に近接して下方に導入し、ここで、ペレットおよびピペットチップの側方位置は、ペレットを乱すために十分な互いの間の物理的相互作用を回避するため、ペレットおよびピペットチップに関して十分に間隔が空いている；

l．磁力によって、磁気粒子のペレットを保持しながら、それぞれのウェルから、単離された生物学的ターゲット物質を含有する溶出液を抜き取る工程を含む、前記方法である。

【0012】

本明細書記載の方法は、当該技術分野において以前用いられていたアプローチに勝る多くの利点を与える。

特に、磁気粒子の収集に関する効率の増加は、問題の生物学的物質の収量の改善を可能にする。さらに、磁気勾配を通じた収集に際して、よく定義された位置での粒子の集合は、粒子の大部分を湿らせることが可能であり、そして/または比較的低温のそれぞれの溶出剤中に懸濁することが可能であるため、比較的高い溶出体積の必要性を減少させる。

【0013】

10

20

30

40

50

上述のように、Wittらは、ナノ粒子などのより小さい粒子よりも、収集がより容易であり、そしてしたがってより効率的であるため、より大きいサイズの粒子を用いることを示唆する。

【0014】

より大きい磁気粒子の別の欠点は、匹敵する材料を用いた際、より大きい粒子はより大きい質量と相関するため、試料調製に用いる懸濁液中でより迅速に沈降することである。しかし、効率が高く、そして再現可能な化学反応を容易にするため、磁気粒子はそれぞれの液体マトリックス中に均一に分布するように維持される必要があり、これは典型的には、攪拌、回転、吸引/分配等の手段による、反復/周期的またはさらに連続再懸濁によって達成される。こうした再懸濁手段は、しばしば、個々の再懸濁手段の間により長い間隔がある方が好適であるように、他の処置を妨害する。

10

【0015】

本明細書に開示する方法は、問題の磁気粒子のサイズに関わらず、効率的な粒子収集のための手段を提供する。したがって、それに応じて低い沈降係数を持つナノビーズでさえ使用可能である。

【0016】

特定の加速度 a を持つ遠心分離であっても、または加速度 a が重力定数 g に対応する、「単なる」重力であっても、粒子の沈降係数 s を用いて、沈降プロセスにおけるその振る舞いが特徴づけられる。沈降係数は、適用される（沈降を引き起こす）加速度に対する粒子の沈降速度の比と定義される。

20

【0017】

用語

「生物学的ターゲット物質」または「生物学的物質」は、本開示の意味において、すべての種類の生物学的分子、例えばタンパク質または核酸を含むが、また、天然に存在するか、あるいはその誘導体または合成類似体または変異体である他の分子も含む。さらに、用語「生物学的物質」は、ウイルスならびに真核および原核細胞を含む。いくつかの態様において、生物学的ターゲット物質は、核酸、例えばDNA、RNAまたはPNAである。DNAは、例えばウイルスDNA、ゲノムDNAまたはプラスミドDNAであってもよい。生物学的ターゲット物質は、天然であってもまたは修飾されていてもよい。天然生物学的物質は、それぞれの天然存在生物学的物質、例えば生物から単離されたDNAまたはRNAに比較した際、不可逆的に改変されていない。修飾生物学的物質は、例えばバイオチン化分子、例えば核酸またはタンパク質を含む。

30

【0018】

本明細書において、用語「液体試料」は、関心対象の分析物を潜在的に含有しうる液体物質を指す。「液体試料」が「液体生物学的試料」である態様において、試料は任意の生物学的供給源、例えば血液、唾液、眼内液 (ocular lens fluid)、脳脊髄液、汗、尿、糞便、精液、腔液、母乳、腹水、粘液、滑液、腹腔液、羊水、組織、培養細胞等を含む、生理学的液体に由来してもよい。試験試料を使用前に前処理してもよく、例えば、血液から血漿を調製するか、粘液を希釈するか、または一般に希釈するか、溶解するかまたは同様の処理をしてもよい。治療法は、濾過、蒸留、濃縮、干渉構成要素の不活性化、および試薬の添加を伴ってもよい。生物学的試料を供給源から得られたまま直接用いてもよいし、または試料の特性を修飾する前処理の後に用いてもよい。いくつかの態様において、最初に固体であったかまたは半固体であった生物学的物質を、適切な液体媒体に溶解するかまたは懸濁することによって、これらを液体にする。いくつかの態様において、生物学的試料は、特定の抗原または核酸を含有すると推測される。

40

【0019】

本明細書に開示する「磁気粒子」は、ナノビーズ等を含むビーズのような粒子状物質であってもよい。いくつかの態様において、これらは、例えば分子、細胞またはウイルスであってもよい特定の生物学的ターゲットに結合するための分析物結合粒子である。これらの態様において、粒子は、特異的または非特異的結合分子、例えば核酸捕捉プローブ、m

50

R N A に結合するためのオリゴまたはポリ (d T) 鎖、免疫グロブリンの F c 部分に結合するためのプロテイン A、特定のタンパク質に結合するための抗体の F a b 断片、ヒスチジンタグに結合するためのニッケル、ストレプトアビジンまたはビオチン、インテグリン、アドヘシン、あるいは他の細胞表面分子等でコーティングされた表面を有してもよい。いくつかの態様において、特定の細胞が分析物結合粒子によって捕捉されるように、生物学的ターゲット分子は、細胞表面分子である。例えば、血液試料に関して、白血球、赤血球、単球の細胞表面抗原に特異的に結合する適切な抗体が当業者に知られ、例えば、T 細胞に関する C D 2 / C D 3、単球に関する C D 1 4、顆粒球および単球に関する C D 1 5、マクロファージに関する C D 1 6、血小板、単球およびマクロファージに関する C D 3 6、白血球に関する C D 4 5 がある。さらなる態様において、分析物結合粒子は金属酸化物またはシリカ表面を有する。二酸化ケイ素表面、例えばガラス表面を用いて、カオトロピック剤の存在下で、核酸に結合させることも可能である。本明細書に開示する背景において特に有用な磁気粒子には、E P 2 9 1 6 3 2 7 (ナノビーズ) または E P 1 2 8 1 7 1 4 に解説されるものが含まれる。上述のように、E P 2 9 1 6 3 2 7 に開示されるものなどのナノビーズは、低い沈降速度を生じる比較的低い沈降係数を含む、その物理的特性のため、特に好適である。本明細書に開示する方法およびデバイスは、常磁性、超常磁性、強磁性またはフェリ磁性粒子を用いて実行されてもよく、これらはすべて本開示の態様の一部であるが、E P 2 9 1 6 3 2 7 の粒子はフェリ磁性である。より正確には、これらは、独立の一般的核酸結合のための単分散シラン処理フェリ磁性酸化鉄粒子であり、以下の特性を有する粒子である：F e ₃ O ₄ を含む内層、および F e ₂ O ₃ を含む外層を含むコア、ケイ酸ナトリウム沈殿由来のシリカおよびケイ酸塩を含むコーティング、6 0 μ m / s 未満の純水中の沈降速度、および少なくとも 6 0 分間の 1 M H C l 中の粒子上で、有意な鉄ブリーディング (b l e e d i n g) が起こらないこと。いくつかの態様において、磁気粒子は 5 0 n m ~ 5 0 μ m、または 1 0 0 n m ~ 2 5 μ m、または 5 0 0 n m ~ 5 μ m の平均直径を有する。特定の態様において、磁気粒子は約 1 μ m の平均直径を有する。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 0 】

1 つの態様において、単分散シラン処理フェリ磁性酸化鉄粒子のサイズの相違は、平均して 5 % より小さい。特定の態様において、粒子サイズは n の値を有し、ここで n は 2 0 n m ~ 6 0 0 n m である。より特定の態様において、粒子サイズは n の値を有し、ここで n は 1 0 0 n m である。特定の態様において、粒子の直径は n の値を有し、ここで n は 1 0 0 n m である。1 つの特定のバッチの粒子サイズは、液体グリコールにおける鉄 (I I) 塩の濃度を調節することによって変化させることも可能である。しかし、1 つの特定のバッチのシラン処理フェリ磁性酸化鉄粒子のサイズは、本質的に、そのバッチ内のすべての粒子に関して同じであることを理解しなければならない。本質的に、粒子の同じサイズは、本明細書の背景において、粒子のサイズの相違が、平均 5 % より小さいことであるように解釈されなければならない。

【 0 0 2 1 】

本明細書に記載する背景において、「マルチウェルプレート」は、生物学的または化学的アッセイに供するべき試料のため、試験管として用いられるウェルまたは空洞の形の多数の反応チャンバーを含む本質的に平坦なプレートを構成し、ここで、マルチウェルプレートは、任意の適切な種類の利用可能な材料、例えばガラス、プラスチック、水晶、またはシリコンで作製されていてもよく、そして典型的には 6、2 4、4 8、9 6、3 8 4、1 5 3 6 またはさらにより多くの試料ウェルを提供し、これらはしばしば、m x n パターン (m および n は正の整数)、例えば 2 x 3 長方形マトリックスで配置される。マルチウェルプレートが A N S I / S L A S (以前、S B S として知られた) 標準に適合する場合、これらを、同等に標準化されたデバイスおよび系、例えばマルチピペッター、磁気プレート、光学分析装置等において、またはこれらとともに、直接用いてもよい。マルチウェルプレートのウェルは、中で行われる分析反応に干渉しないように、内側では化学的に不活性であってもよい。他の態様において、これらは、生体分子などの結合分子でコーティ

ングされていてもよい。例えば、ターゲット核酸または他の核酸のいずれかに結合するための捕捉分子として作用する生体分子の例には、配列特異的核酸捕捉プローブ、例えばDNAまたはLNA（ロックド核酸）プローブが含まれる。別の例は、ターゲット核酸でのピオチンタグとの相互作用のためのストレプトアビジンであろう。本明細書に記載する背景において有用なマルチウェルプレートは、ミリからセンチメートル範囲、例えば1mm~5cm、または2.5mm~2.5cm、または5mm~1.5cm、またはこれらの範囲の任意の組み合わせの、丸形、多角形、例えば六角形等であってもよい、ウェル開口部で測定する直径またはレンチサイズを持つウェルを有してもよい。いくつかの態様において、ウェルは約1cmの直径またはレンチサイズを有する。しばしば用いられる、mが垂直位置を示し、そしてnが水平位置を示す、m×n配置において、mまたはn位の2つのウェルの間の距離または間隔は、4.5~18mmの間、または7~12mmの間、または約9mmであってもよい。標準SBS 96ウェルプレートの場合、mおよびn方向両方の距離は9mmである。他の態様において、m方向の距離およびn方向の距離が互いに異なる場合もありうる。本明細書に記載するようなマルチウェルプレートは、光学的に透明な領域にウェルを含んでもよい。高い光学的透明度および低レベルの自己蛍光を与える適切な材料には、例えば、ガラス、プラスチック、水晶、シリコン等が含まれる。いくつかの態様において、材料は、環状オレフィンポリマー（COP）またはコポリマー（COC）である。他の適切な材料が当業者に知られる。いくつかの態様において、同じ光学的に透明な材料で、マルチウェルプレート全体が作製される。他の態様において、非透明領域、例えばマルチウェルプレートの縁に向かう部分は、異なる材料、例えば、取り扱いおよび保護の目的等のためによりロバスタな材料で作製されていてもよい。

10

20

【0022】

本明細書に開示する方法およびデバイスの目的のため、マルチウェルプレートは、複数の磁石のあらかじめ決定された幾何学的配置に対応する位置で凹部を含む。好適には、凹部は、ウェルとは反対のプレートの面上に形成されてもよい。例えば、凹部は、m×nパターンで配置された4つのウェルの中央に、しかし反対側に位置してもよい。したがって、特に磁石が直方体状、桿状またはピン様の形状を有する態様においては、磁石を凹部に導入して、そしてそれによって、それを取り巻く4つのウェルにごく近接して配置し、こうしてウェルおよびその内容物に磁気勾配を課してもよい。

【0023】

「磁気分離プレート」は、磁気粒子の分離に有用なデバイスである。該デバイスは、「支持プレート」および磁石を含み、ここで、「支持プレート」は、典型的には、通常、支持プレートに対して垂直である定義された位置に磁石を所持し、そして保持するための本質的に平坦なデバイスである。前記プレートは、1つまたはそれより多い部分および異なる材料、例えば金属またはプラスチックで作製されてもよい。1つの態様において、プレートは金属製である。支持プレートは、互いに固定された上部および下部プレートを含んでもよい。

30

【0024】

いくつかの態様において、磁石は、本質的に、ピンまたは桿状磁気または磁化可能構造である。こうした磁気ピンまたは桿状体の長さは、2~100mm、または15~50mmであってもよい。その直径は1~20mm、または2~6mmであってもよい。さらなる態様において、磁石は本質的に直方体状である。より特定の態様において、これらの直方体は、SBS形式を有するマルチウェルプレートに対応する寸法で、磁気分離プレートのxまたはy軸に沿って広がる。それに応じて、こうした直方体は、約7.5cm（y方向）、または約12cm（x方向）の長さを有してもよい。高さは約5mm~10mmの間であってもよい。図に示すように、マルチウェルプレートが標準SBS 96ウェルプレートである態様においては、マルチウェルプレートに対して側方の移動を実行するため、十分な側方クリアランスを伴って、ウェル間の凹部に適合するように、直方体状磁石の幅は2~3mmの間であってもよい。

40

【0025】

50

磁石に働く外部の力が存在しない場合、磁石および支持プレートとの間の角度は、本質的に直角であってもよい。1つの態様において、角度は80～100°の間、または85°～95°の間、または約90°である。

【0026】

「あらかじめ決定された幾何学的配置」は、本開示の背景において、磁石または対応する凹部などの物理的物体群の要素間の定義された空間的および方向的関連を意味する。

「ピペッター」は、流体トランスファーまたは吸引および排出 (s i p a n d s p i t) 混合のためなどの流体体積の自動的抜き取りおよび/または分配を可能にするデバイスである。本明細書記載の背景において、これらの流体には、液体生物学的試料、液体生物学的試料をプロセッシングするために用いる試薬、洗浄溶液、希釈緩衝液、プロセッシングされた液体、プロセッシングされた分析物を含有する液体等が含まれる。液体を以下の位置/容器のいずれかから抜き取りそして分配してもよい：試料チューブ、中間プロセスチューブ、試薬容器、廃棄物容器または位置、チップ洗浄ステーション、排出容器、反応チューブ等。特に、本明細書記載のマルチウェルプレートのウェル内に、流体生物学的試料を分配するか、またはそこから試料を抜き取るために、ピペッターを用いてもよい。ピペッターは、いくつかの態様において、空気圧系または水力系によって駆動される。圧媒液として、ピペッターは、いくつかの態様において、水または一般的に用いられる試薬を用いてもよい。

【0027】

ピペッターは、1つまたはそれより多い再利用可能洗浄可能針、例えばスチール針を含んでもよいし、または使い捨てピペットチップを用いてもよい。例えばガイドレールを用いて、平面において一方向または二方向移動で、そしてスピンドルドライブ等で平面に直交性である第三の方向の移動で移動しうるトランスファーヘッドに、ピペッターを搭載してもよい。例えば、一次試料チューブおよびマルチウェルプレートまたは別のターゲット位置の間で、ピペッターを水平に移動させ、そして液体生物学的試料または他の液体を抜き取るかまたは分配するために、垂直に移動させてもよい。ピペッターは、作業セル中に一体化され、すなわち組み込まれていてもよいし、または作業セルに機能可能であるように連結された系のモジュールであってもよい。ピペッターの位置および操作(体積、流速、流動方向等のパラメータを含む)は、本明細書に記載するような制御装置によって制御される。

【0028】

「制御装置」は、プロセッシングプロトコルの必要な工程が、自動化系によって実行される方式で、自動化系を制御する。これは、制御装置が、例えば、自動化系に命令して、ピペッターに、液体生物学的試料と試薬を混合する特定のピペッティング工程を行わせることが可能であるか、あるいは制御装置が、特定の時間、特定の温度で、生物学的試料または試薬または両方の混合物をインキュベーションするように自動化系を制御するか、あるいは制御装置が、本明細書記載の磁気分離プレートおよび/またはマルチウェルプレートおよび/またはピペッターの正確な移動、または他の移動もしくは関連するパラメータを制御することを意味する。制御装置は、データ管理装置(DMU)から、特定の試料ではどの工程を実行する必要があるかに関する情報を受け取ってもよい。いくつかの態様において、制御装置は、データ管理装置と一体化していてもよいし、または共通のハードウェアによって統合されてもよい。制御装置は、例えば、プロセス操作計画にしたがって操作を実行する命令とともに提供される、コンピュータ読み取り可能プログラムを実行するプログラム可能論理制御装置として統合されてもよい。特に、制御装置には、あらかじめ定義された時間内の、上述のような移動などの一連の工程を実施するためのスケジューラが含まれてもよい。制御装置は、アッセイタイプ、緊急性等にしたがって、プロセッシングされるべき試料の順序をさらに決定してもよい。制御装置はまた、試料のパラメータの測定に関連する検出装置からデータを受け取ってもよい。

【0029】

「データ管理装置」は、データを保存し、そして管理するための計算装置である。これ

10

20

30

40

50

は、自動化系によってプロセッシングされるべき液体試料に関するデータ、または回転可能容器内で実行されるべき工程に関するデータを含んでもよい。データ管理装置は、L I S（実験室情報系）および/またはH I S（病院情報系）に連結されていてもよい。データ管理装置（D M U）は、相互作用する自動化系内にあるかまたはそれと共局在する装置であってもよい。該装置は制御装置の一部であってもよい。あるいは、D M Uは、自動化系から遠隔に位置する装置であってもよい。例えば、該装置は、自動化系にネットワークを通じて連結されているコンピュータにおいて統合されていてもよい。

【0030】

「洗浄緩衝液」は、特に精製法において、望ましくない構成要素を取り除くために設計された液体である。こうした緩衝液は当該技術分野に周知である。洗浄緩衝液は、固定された分析物を、いかなる望ましくない構成要素からも分離するため、磁気粒子を洗浄するために適している。洗浄緩衝液または他の溶液は、しばしば、使用前に希釈する必要があるストック溶液として提供される。洗浄緩衝液は、例えば、上述のように、エタノールおよび/またはカオトロピック剤を含まない、酸性pHの単数または複数の緩衝溶液中に、エタノールおよび/またはカオトロピック剤を含有してもよい。

10

【0031】

「溶出緩衝液」は、結合している固体支持体、例えば本明細書記載の方法で用いる磁気粒子から生物学的ターゲット物質を分離するために適した液体である。こうした液体は、例えば、蒸留水または脱イオン水または水性塩溶液、例えばT r i s H C lのようなT r i s緩衝液、またはH E P E S、または当業者に知られる他の適切な緩衝液であってもよい。こうした溶出緩衝液のpH値は、生物学的ターゲット物質が核酸である場合、好ましくはアルカリ性または中性である。前記溶出緩衝液は、例えば、分解酵素の不活性化によって例えば核酸のような単離生物学的ターゲット物質を安定化する、E D T Aのようなキレート剤のような保存剤などの、さらなる構成要素を含有してもよい。いくつかの態様において、核酸溶出緩衝液のような溶出緩衝液は、低塩濃度、例えば0.1 Mまたはそれより低い濃度などを有する。

20

【0032】

上述のように、本明細書記載の方法およびデバイスの利点の1つは、少ない液体体積中で、比較的少量の単離生物学的ターゲット物質を得ることであり、これは、多様な重要な分析技術に必要とされるような、高濃度の問題の分析物が得られることを意味する。

30

【0033】

したがって、いくつかの態様において、本明細書記載の方法の工程h)で用いる溶出緩衝液の体積は、 $1\ \mu\text{l} \sim 100\ \mu\text{l}$ 、または $5\ \mu\text{l} \sim 50\ \mu\text{l}$ 、または $10\ \mu\text{l} \sim 35\ \mu\text{l}$ 、または約 $20\ \mu\text{l}$ である。

【0034】

本明細書に開示する方法のいくつかの態様において、磁場勾配を課すことによって、複数の磁気粒子が工程c)で形成される。よりよく定義された方式で、本明細書記載の方法を実行するために、これらの多数のペレットを一体化することが好適でありうる。

【0035】

この目的のため、本明細書記載の方法の工程d)は、いくつかの態様において、以下の下位工程からなる：

40

I. 中央収集位置に到達するように、マルチウェルプレートおよび/または磁気分離プレートを互いに対して相対的に移動させて、ここで、移動は、ペレットが、磁場勾配によって、それぞれのウェルの頂部から底部への方向で、内壁に沿って移動して、ウェル底部でプールされて、単一のペレットを形成するように、垂直および側方方式で行われる；

II. 下部周辺収集位置に到達するように、マルチウェルプレートおよび/または磁気分離プレートを互いに対して相対的に移動させる、ここで、移動は、ペレットが、磁場勾配によって、第二の特定の高さに到達するように、それぞれのウェルの底部から頂部への方向で、内壁に沿って移動するように、垂直および側方方式で行われる。

【0036】

50

本質的に、本明細書記載の方法は、こうした態様において、以下の一連の工程を含む：

a．開放頂部および閉鎖底部を持つ複数のウェルを有するマルチウェルプレートを提供し、ここで、複数のウェルの少なくとも一部は、第一の液体体積において、液体試料および結合表面を持つ磁気粒子の懸濁物を含み、マルチウェルプレートは磁気分離プレートの複数の磁石のあらかじめ決定された幾何学的配置に対応する位置で凹部をさらに含む；

b．磁気分離プレートの磁石が磁気粒子を移動させるために十分な強度でマルチウェルプレートのウェル内に磁場勾配を引き起こさないように、互いに十分な距離である、マルチウェルプレートおよび磁気分離プレートのインキュベーション位置において、磁気粒子の表面に生物学的ターゲット物質が結合する条件を用いて、液体試料および磁気粒子をインキュベーションし；

c．上部周辺収集位置に到達するように、マルチウェルプレートの凹部内に、磁気分離プレートの磁石を導入し、ここで、各磁石は、ウェルの内部空間に磁場勾配を課すように、対応するウェルの外壁に十分に近接しており、それによって、第一の特定の高さで、それぞれのウェルの内壁に磁気粒子のペレットを形成する；

d．中央収集位置に到達するように、マルチウェルプレートおよび/または磁気分離プレートを互いに対して相対的に移動させて、ここで、移動は、ペレットが、磁場勾配によって、それぞれのウェルの頂部から底部への方向で、内壁に沿って移動してウェル底部でプールされるように、垂直および側方方式で行われる；

そして

下部周辺収集位置に到達するように、マルチウェルプレートおよび/または磁気分離プレートを互いに対して相対的に移動させて、ここで、移動は、ペレットが、磁場勾配によって、第二の特定の高さに到達するように、それぞれのウェルの底部から頂部への方向で、内壁に沿って移動するように、垂直および側方方式で行われる；

e．ピペッターの複数のピペットチップをマルチウェルプレートのウェル内に、そしてピペットチップで液体の可能な最大量を抜き取るために、ウェルの底部に十分に近接して下方に導入し、ここで、ペレットおよびピペットチップの側方位置は、ペレットを乱すために十分な互いの間の物理的相互作用を回避するため、磁気粒子のペレットおよびピペットチップに関して十分に間隔が空いている；

f．磁力によって、磁気粒子のペレットを保持しながら、それぞれのウェルから液体を抜き取り；

g．随意に、生物学的ターゲット物質を磁気粒子上に保持しながら、磁気粒子の表面から望ましくない構成要素を除去するため、洗浄緩衝液をウェルに添加し、次いで、磁力によって、磁気粒子のペレットを保持しながら、それぞれのウェルから液体を抜き取り；

h．マルチウェルプレートの凹部から、マルチウェルプレートおよび磁気分離プレートのインキュベーション位置に、磁気分離プレートの磁石を回収し、そしてウェルに溶出緩衝液を添加して、第二の液体体積を生じ、ここで、第二の液体体積は第一の液体体積より少ない、そしてその中で磁気粒子を再懸濁し；

i．溶出緩衝液で、磁気粒子から生物学的ターゲット物質を溶出させ；

j．磁気分離プレートの磁石を、上部または下部周辺収集位置に到達するように、マルチウェルプレートの凹部内に導入し、ここで、各磁石は、ウェルの内部空間に磁場勾配を課すように、対応するウェルの外壁に十分に近接しており、それによって、第一または第二の特定の高さで、それぞれのウェルの内壁に磁気粒子のペレットを形成する；

k．ピペッターの複数のピペットチップをマルチウェルプレートのウェル内に、そしてピペットチップで液体の可能な最大量を抜き取るために、ウェルの底部に十分に近接して下方に導入し、ここで、ペレットおよびピペットチップの側方位置は、ペレットを乱すために十分な互いの間の物理的相互作用を回避するため、ペレットおよびピペットチップに関して十分に間隔が空いている；

l．磁力によって、磁気粒子のペレットを保持しながら、それぞれのウェルから、単離された生物学的ターゲット物質を含有する溶出液を抜き取る。

【 0 0 3 7 】

10

20

30

40

50

存在するならば、多数のペレットのプールから利益を得るために、こうした特定の工程 d . を、いくつかの態様において、本明細書に開示する方法の工程 g . および / または工程 j . に続いて反復してもよい。

【 0 0 3 8 】

本開示の別の側面は、液体試料から生物学的ターゲット物質を単離するためのプレ分析系であり、該プレ分析系は：

- 開放頂部および閉鎖底部を持つ複数のウェルを有するマルチウェルプレートであって、複数のウェルの少なくとも一部が、第一の液体体積において、液体試料および結合表面を持つ磁気粒子の懸濁物を含み、マルチウェルプレートが磁気分離プレートの複数の磁石のあらかじめ決定された幾何学的配置に対応する位置で凹部をさらに含む、前記マルチウェルプレート；

- ガイドスクリーンおよび磁気分離プレートを含む磁気分離デバイスであって、ガイドスクリーンがマルチウェルプレートおよび / または磁気分離プレートに対して本質的に垂直であり、そしてマルチウェルプレートおよび / または磁気分離プレートの互いに対して相対的な移動を導くためのガイドレールを有し、磁場勾配によって、磁気粒子のペレットがマルチウェルプレートのウェルの内壁に沿って移動するように、移動が垂直および側方方式で行われる、前記磁気分離デバイスの要素を含む。

【 0 0 3 9 】

本明細書に開示する方法を実施するために、プレ分析系を好適に用いてもよい。

いくつかの態様において、磁気分離デバイスは、マルチウェルプレートを受け入れるため、上面にフレームを含む。より特定の態様において、ガイドスクリーンはフレームに物理的に連結される。

【 0 0 4 0 】

特定の態様において、マルチウェルプレートは、標準 S B S 形式にしたがった寸法を有する。他の利点の中でもとりわけ、この態様は、本明細書記載の方法および本明細書記載の系における安価な既製の消耗品の使用を容易にする。

【 0 0 4 1 】

本明細書に開示する方法のすべての他の特定の態様はまた、本明細書開示のプレ分析系にも当てはまる。

【実施例】

【 0 0 4 2 】

以下の実施例は、本明細書に開示する方法およびプレ分析系の特定の態様を例示することを意味するが、これらは限定するものではない。

図 1 の模式図は、本明細書記載の方法の態様の横断側面図を示す。明確にするため、マルチウェルプレート (2 0 0 、未提示) の 1 つのウェル (2 1 0) を、磁気分離プレート (4 0 0 、未提示) に含まれる 2 つの直方体状磁石 (4 1 1 、 4 1 2) と相互作用する、独立の 1 つの容器として示す。示す態様中の磁気粒子 (2 3 0) は、磁気ビーズ、例えば磁気ガラスビーズ、官能化表面を持つ磁気ビーズ等である。図 1 A ~ K に示す画像は、本明細書に開示する方法の工程に相当する。

【 0 0 4 3 】

図 1 A は、インキュベーション位置 (1 0 0 0) にある磁石およびウェル (2 1 0) を示し、ここで、上述の 2 つの個々の磁石 (4 1 1 、 4 1 2) によって構成される示す態様中の磁石 (4 1 0) は、液体試料 (2 2 0) 中に存在する磁気ビーズ (2 3 0) が、有意には磁石の影響下でない、すなわちウェルに課される磁場勾配が磁気ビーズ (2 3 0) を移動させるほど十分には強くないように、ウェル (2 1 0) から十分な距離に位置する。本明細書記載の方法をまた、磁石 (4 1 0) が単一の磁石のみである態様でも実施可能であることが理解されるものとする。例えば、本図に関して、本明細書に開示する方法を、磁石 (4 1 1 、 4 1 2) の 1 つのみで行ってもよい。インキュベーション位置 (1 0 0 0) は、主に、結合、洗浄または溶出中に用いられ、ここで、ビーズ (2 3 0) は、液体試

10

20

30

40

50

料(220)、あるいはそれぞれ、洗浄緩衝液または溶出緩衝液中に均一に懸濁される必要がある。

【0044】

図1Bは、上部周辺収集位置(1001)を示し、ここで、磁石(411、412)は、ウェル(210)の壁に、磁気ビーズ(230)をビーズ集団中で誘引するため、マルチウェルプレート(200)のウェル(210)に十分に近接している。示す場合には、いくつかの磁石(411、412)が、ウェル(210)あたりいくつかのビーズ集団(241、242)を誘引する。例示のため、線(1001)は、磁気粒子(230)が磁場勾配によって誘引されるウェル(210)の第一の特定の高度と一致する、磁石(411、412)のそれぞれの上端を示す。この上部周辺収集位置(1001)は、主に、懸濁された磁気ビーズ(230)の迅速でそして効率的な分離のために用いられる。これは、プロセス体積のほぼ半分の高さ、またはその+/-25%であってもよい。上方を指す矢印は、ウェル(210)に関する磁石(411、412)の移動を示す。磁気ビーズ(230)の集団(241、242)は、磁石(411、412)によって課される磁場勾配が最強である部位で形成され始めていることがわかる。ウェル内壁でのこの形成は、図1Cにおいて完了する。

10

【0045】

ウェル(210)に対する磁石(411、412)の下方移動を図1Dに示す。カーブした点線によって示されるように、この移動は、側方および垂直構成要素の両方を有し、それによって、ペレットとも称される集団(230)を、ウェル(210)の頂部から底部の方向で、ウェル内壁に沿ってスライドさせる。好ましい態様において、移動は下部周辺収集位置(1002)で終わる一方、本図1Dに示す態様は、個々のペレット(241、242)をプールするため、ウェル(210)の底部に向かう、ペレット(241、242)のさらなる輸送を示す。

20

【0046】

このプールを図1Eに示し、ここで、磁石(411、412)およびウェル(210)は、中央収集位置(1003)に到達するよう移動されており、ここで、右側の磁石(412)は、ウェル(210)の底部にビーズを誘引するためにウェル(210)に十分に近接して、本質的にマルチウェルプレートのウェル(210)の中央下方に沿って整列される。したがって、いくつかの集団で存在するビーズ(230)を含む本明細書に示すもののような場合、すべての集団が、ウェル(210)の底部で単一のペレット(240)にプールされる。ここから、図1Fに示す矢印によって示されるように、磁石(411、412)およびウェル(210)の互いに対する対応する移動によって、一体化したペレットが、ウェル内壁に沿って、再び上方に輸送される。

30

【0047】

図1Fは、下部周辺収集位置(1002)を示し、ここで、磁石(411、412)は、プロセッシング容器(210)に非常に近接しており、したがって、磁気ビーズ(230)を、一体化したペレット(240)中で、ウェル(210)の壁に誘引する。位置(1002)は(1001)の下部であり、ここで点線(1002)は、磁場勾配によってペレット(240)が移動する第二の特定の高度を示し、したがって、前記の下部周辺収集位置(1002)を示す。この下部周辺収集位置(1002)にはまた、磁石(411、412)を下方に移動させることによって、図1Cに示す上部周辺収集位置(1001)から直接到達することも可能であることも理解されるものとし、ここで、移動は、垂直および側方構成要素の両方を有し、そしてそれによって、本図1Fに示す位置に、ウェル(210)の壁に沿ってペレット(240)をスライドさせる。この直接移動は、1つのペレット(240)のみが形成されるため、プールが必要でないような、ビーズの多数の集団の形成が予期されない際には、特に好ましい。一般的に、下部周辺収集位置(1002)は主に、例えば、ターゲット物質(900)が(より)少ないプロセッシング液(220)、例えば溶出緩衝液に溶出された後に用いる少ない液体体積中で、磁気ビーズ(230)を誘引するために用いられる。ペレット(240)の位置は、容器の底部より上であり

40

50

、そして典型的には、プロセッシング液（２２０）の上部レベルより下である。

【００４８】

図１Ｇにおいて、ウェル（２１０）の開放頂部内へのピペットチップ（２６０）の導入直前を示す。ピペットチップ（２６０）の右側の下方を指す矢印によって、ウェル（２１０）に対するその移動を示す。ピペットチップ（２６０）の側方位置は、先細ウェル（２１０）の底部を通過する中央軸（１１００）の左に向かってわずかにシフトしている一方、示す下部周辺収集位置（１００２）のペレット（２４０）は、ウェル（２１０）の内壁の中央軸（１１００）の右に位置することがわかる。

【００４９】

図１Ｈに示すようなピペットチップ（２６０）のウェル（２１０）内への導入に際して、ピペットチップ（２６０）は、チップ（２６０）内の上方を指す矢印によって示されるように、ウェル（２１０）から液体（２２０）を吸引し始める。他の態様において、吸引は、チップ（２６０）がその（最も下方の）終点に到達するまで始まらない。いくつかの態様において、液体吸引は、ピペットチップ（２６０）が液体表面に接触した際に始まり、これを、当業者に知られる液体レベル検出によって監視してもよい。こうした液体レベル検出（ＬＬＤ）は、例えば、電気容量測定、抵抗または磁気抵抗測定、超音波、光学、または他の適切な検出手段、あるいはその任意の組み合わせを含んでもよい。

【００５０】

図１Ｉにおいて、ピペットチップ（２６０）は最も下部の終点に到達し、そして液体吸引が終わる。図解からわかるように、液体（２２０）はピペットチップ（２６０）を通じて最大の度合いまで抜き取られる。ペレット（２４０）およびピペットチップ（２６０）の側方位置は、ペレット（２４０）を乱すために十分な互いの間の物理的相互作用を回避するため、ペレット（２４０）およびピペットチップ（２６０）に関して、十分に間隔が離れている。

【００５１】

図１Ｊにおいて、ピペットチップ（２６０）をウェル（２１０）から取り除き、そして上清ともまた称されうる、取り除いた液体を適切な廃棄物容器（未提示）に廃棄する一方、ペレット（２４０）は所定の位置に留まり（図１Ｋ）、そしてさらなるプロセッシングの用意ができています。ウェル（２１０）および磁石（４１１、４１２）の配置は、図１Ｇから図１Ｊまでの全吸引処置に関して、下部周辺収集位置（１００２）のままであることがわかる。

【００５２】

図２に示す図は、本明細書に記載する方法の態様にしたがった、一連の随意的洗浄工程を例示する。例えば、図１に示す一連のインキュベーションおよび吸引後、ウェル（２１０）内壁のペレット（２４０）は、下部周辺収集位置で、磁石（４１２）によって所定の位置に維持されたままであり、本図解は図２Ａで始まる。

【００５３】

図２Ｂにおいて、ピペットチップ（２６０）をウェル（２１０）内に導入し、ここで、ペレット（２４０）およびピペットチップ（２６０）の側方位置は、ペレット（２４０）を乱すために十分な互いの間の物理的相互作用を回避するため、ペレット（２４０）およびピペットチップ（２６０）に関して十分に間隔が空いている。図２Ｃにおいて、ピペットチップ内の下方を指す矢印によって象徴されるように、洗浄緩衝液（３００）は、ペレット（２４０）を洗浄するため、ウェル（２１０）内に分配され、そして再び吸引される。洗浄法の効率を改善するため、吸引および分配の工程を数回反復してもよい。いくつかの態様において、粒子（２３０）が再懸濁され、そしてその表面が洗浄剤（３００）に対してよりアクセス可能であるように、配置をインキュベーション位置（１０００）に合わせてもよい。こうした態様において、マルチウェルプレート（２００）および磁石（４１１、４１２）を図２Ｄに示す下部周辺収集位置（１００２）に再度合わせる一方、再懸濁がなければ、この位置（１００２）は、図２Ａ～Ｄの洗浄プロセスを通じて、不変のままである。驚くべきことに、本発明者らは、いくつかの態様において、本明細書記載の方法

10

20

30

40

50

の洗浄法が、磁気粒子(230)の再懸濁を含まず、損なわれていない(intact)ペレット(240)の洗浄を含むようなこの方式で、洗浄法がより効率的でありうることを見出した。

【0054】

図3に移り、図3A~Lに示す順列は、本明細書記載の方法の溶出工程の態様を例示する。

下部周辺収集位置(1002)にある、図3Aに示すペレット(240)を含むウェル(210)は、例えば、図1A~Kに示すインキュベーションの、または図2A~Dに示す洗浄の結果でありうる。いくつかの態様において、ペレット(240)は、慣用的な風乾、または熱の適用等によって乾燥されている。

10

【0055】

図3Bに示すように、ウェル内壁に付着したペレット(240)に対して作用する有意な磁場勾配がないように、磁石(411、412)をウェル(210)に対して下方に移動させて、インキュベーション位置(1000)に到達させる。

【0056】

図3Cは、ウェル(210)内へのピペットチップ(260)の導入を示し、ここで、溶出緩衝液をウェル(210)に添加する。ペレット(240)およびピペットチップ(260)は、互いに側方に間隔が空いているが、ピース(230)は続いて、図3Dに示すように吸引および分配によって再懸濁されるため、これは、この場合には必要ではない。

20

【0057】

再懸濁は図3Eで完了し、配置はなおインキュベーション位置(1000)にあり、その後、図3Fにおいて、磁石(411、412)はウェル(210)に対して移動して、下部周辺収集位置(1002)に到達する。その結果のウェル(210)内壁への磁気粒子(230)の誘因が図3Gでわかる。

【0058】

本明細書に示す態様において、ペレット一体化は、図3Hにおいて、中央収集位置(1003)へのウェル(210)に対する磁石(411、412)の移動、そして続いて再び、下部周辺収集位置(1002)に到達する上方に戻る移動によって達成される。本明細書において上述するように、この工程はまた、いくつかの態様において省略可能である。

30

【0059】

図3Jにおいて、ピペットチップ(260)をウェル(210)内に導入し、ここで、ペレット(240)およびピペットチップ(260)の側方位置は、ペレット(240)を乱すために十分な互いの間の物理的相互作用を回避するため、ペレット(240)およびピペットチップ(260)に関して十分に間隔が空いている。図3Kにおいて、溶出液の可能な最大量の吸引が完了したら、ピペットチップをウェル(210)から取り除く一方、ペレット(240)は、下部周辺収集位置(1002)に、示す場合では特に、本質的に磁石(412)によって誘発される磁場勾配中に、磁石(411、412)によって発揮される磁力によって保持される。図3Lにおいて、分析物含有溶出液を受け取るため、異なる新鮮な容器(270)を利用する。

40

【0060】

磁気分離デバイス(500)中のマルチウェルプレート(200)および磁気分離プレート(400)の配置を、図4の異なる透視図で示す。

図4Aは、磁気分離デバイス(500)のソケット(560、図4Fに示す)上に搭載されたマルチウェルプレート(200)を示す。示す態様において、マルチウェルプレート(200)は、標準SBS 96ウェルプレートである。こうしたプレートは、当該技術分野においてよく確立されており、そして多様な供給業者から商業的に入手可能である。磁気分離プレート(400)の磁石(410)は、マルチウェルプレート(200)によって隠されている。

50

【0061】

マルチウェルプレート(200)は、示す態様において、マルチウェルプレート(200)の縁(280)上にソケット(560)のダウンホルダー(510)を押し付けることによって、ソケット(560)に固定される。

【0062】

作動装置(520)を用いて、垂直方向(z軸)に、磁気分離プレート(400)の可動性を与える。示す態様において、作動装置(520)は、駆動ベルト(523)によって連結された駆動ホイール(521)および駆動ギア(522)を含む。示す態様において、後者のより大きなホイール(522)は、駆動軸(525、隠されている)を通じて、リフティングアーム(524、隠されている)に連結されている。この配置は、図の下部左隅のz軸によって示されるように、磁気分離プレート(400)の垂直可動性を与える。x軸の方向の側方可動性は、スライド(530)上に磁気分離プレート(400)を搭載することによって達成される。x軸に沿った磁気分離プレート(400)の実際の移動は、磁気分離プレート(400)の専用マウント(420)およびガイドスクリーン(540)中の切り抜き(541、542)の間の相互作用によって間接的にもたらされ、ここで、切り抜き(541、542)は、専用マウント(420)の、そしてしたがって最終的には磁気分離プレート(400)のガイドレールとして働く。図1~3に示すカーブした点線と関連して、これらのガイドレール(541、542)は、磁気分離プレート(400)の垂直および側方移動を定義し、そしてしたがって、マルチウェルプレート(200)のウェル(210)に対する磁石(400)の移動を定義する。したがって、この態様において、磁石(400)の側方移動は受動性のものであるが、側方移動を直接駆動する第二の作動装置(未提示)もまた可能である。この態様において、側方移動はx軸に制限されるが、y軸の移動は必要ではない。

【0063】

この移動は、好適に、例えば必要なハードウェアの複雑さを減少させるため、本明細書に開示する方法のいくつかの態様において、互いに対するマルチウェルプレート(200)および/または磁気分離プレート(400)の側方移動は、一次元であり、これは、x軸またはy軸の1つのみに沿ったものであることを意味する(両軸は水平)。

【0064】

図4Bは、磁気分離プレート(400)が可視であるように、マルチウェルプレート(200、未提示)を取り外した、図4Aにおけるものと同じ態様の透視図を示す。この態様の磁石(410)は、垂直極性を持つ棒としての形状であり、すなわち棒の上面がN極である一方、下面がS極であってもよい。いくつかの態様において、極性は、隣り合う磁気棒(410)間で交互であってもよいし、または磁気分離プレート(400)上の配置全体で同じであってもよい。交互極性は、磁場の均一性の改善に寄与しうる。磁石(410)は、これらが、マルチウェルプレート(200)のウェル(210)の対応する列間に位置するように、幾何学的にあらかじめ決定された方式で配置される。横断側面図において、2つの磁石(410)間の1つのウェル(210)は、図1~3の図解に対応し、ここで、本質的に直方体状の磁気棒(410)は長方形の形状(411、412)で現れる。磁石(410)およびウェル(210)の互いに対する側方および垂直移動を、それに応じて記載することも可能である。本図は、磁石(410)がマスク(440)の凹部(450)から突出する一方、磁気分離プレート(400)の脚部がマスク(440)の下に位置する態様を示す。したがって、マスク(440)は、磁気分離プレート(400)上の磁石(410)の安定な配向に寄与する。

【0065】

図1~3および図4、それぞれの図解の間の関連を、図4Cおよび図4Dの透視的横断図によって、より詳細に例示する。マルチウェルプレート(200)および磁気分離プレート(400)の前面を切り、ウェル(210)列の内側および磁石(410)の横断面を明らかにする。この図解はまた、x軸に沿った磁気分離プレート(400)の可動性を与えるガイドレール(531、532)を伴うスライド(530)も示す。この横断図で

さらに可視であるのは、作動装置(520)の駆動ホイール(521)ならびにリフティングアーム(524)であり、これらがレール(525)を通じてその回転をスライド(530)およびしたがって磁気分離プレート(400)にトランスファーすることによって、垂直移動をもたらす。複数の磁石(410)のあらかじめ決定された幾何学的配置に対応する位置で、マルチウェルプレート(200)の対応する凹部(205)内に、磁石(410)がどのように挿入されるかもまたわかる。

【0066】

図4Eは、ウェル(210)の中央軸を通じたマルチウェルプレート(200)の列に沿った横断面の透視図を提供する。この透視図は、スライド(530)のガイドレール(531、533)、ならびにより大きなホイール(522)からリフティングアーム(524)に運動エネルギーをトランスファーする駆動軸(525)の構造への、さらなる洞察を可能にする。

10

【0067】

図4Fは、明確にする目的で、先行する図に示されていないいくつかの要素を示す。異なる角度からのこの透視図において、マルチウェルプレート(200)を保持する磁気分離デバイス(500)のソケット(560)は、底部プレート(570)に固定する柱(550)とともに可視である。この図解にはまた、マルチウェルプレート(200)が、磁気分離プレート(400)の上でプロセッシングされる前またはされた後に、一時的に保存されうる、パーキングトレイ(580)も含まれる。ソケット(560)のダウンホルダー(510)は、ソケット(560)の上面によって部分的に隠されている。

20

【0068】

図4Gは、特に図の上部左隅の拡大図において、マルチウェルプレート(200)およびソケット(560)の相互作用のより詳細な図を示す。わかるように、マルチウェルプレート(200)の縁(280)は、ソケット(560)のフレーム様突起(590)内に適合し、そしてさらに、上述のように、ソケット(560)のダウンホルダー(510)によって固定されている。

【 図 1 】

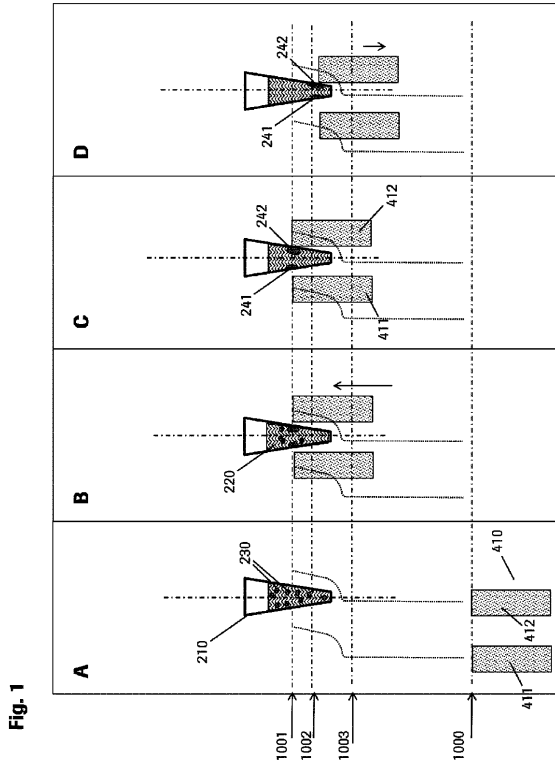


Fig. 1

【 図 1 - 1 】

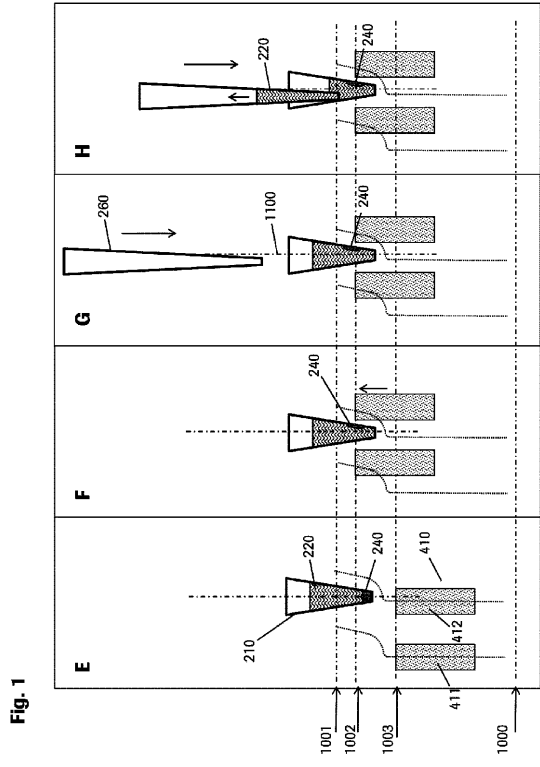


Fig. 1

【 図 1 - 2 】

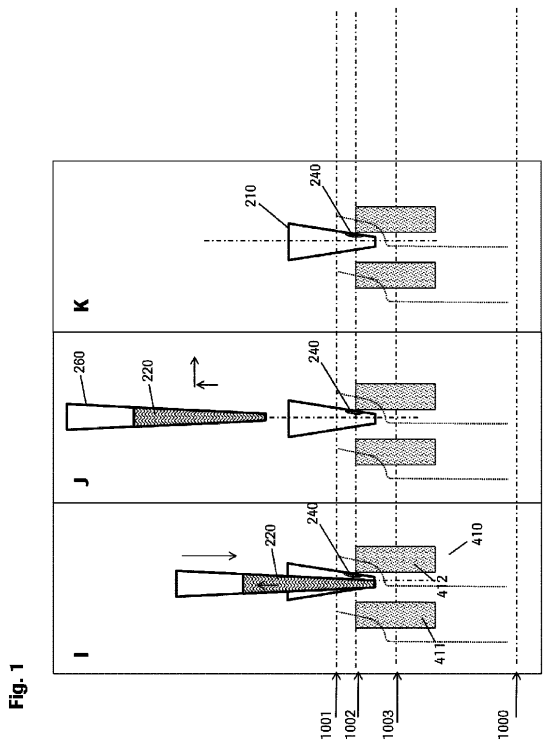


Fig. 1

【 図 2 】

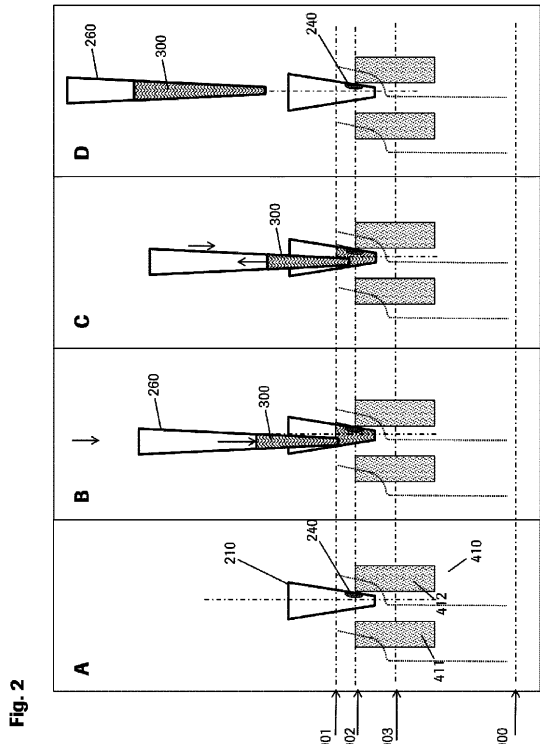


Fig. 2

【 図 3 】

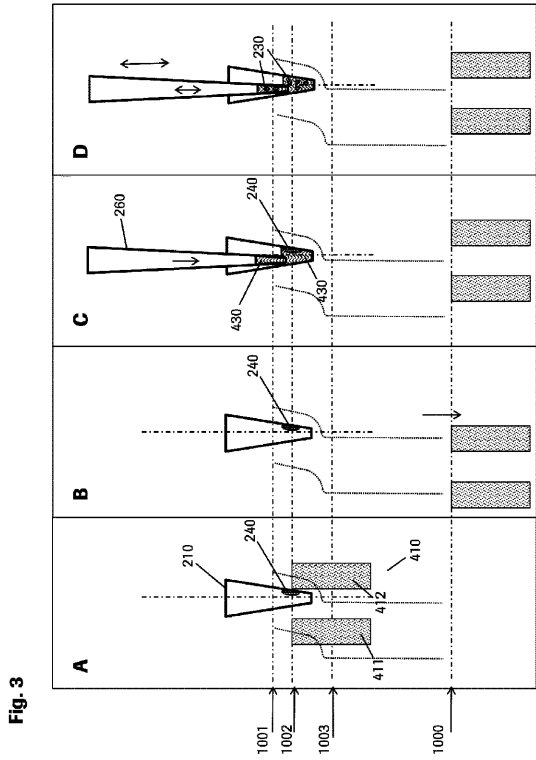


Fig. 3

【 図 3 - 1 】

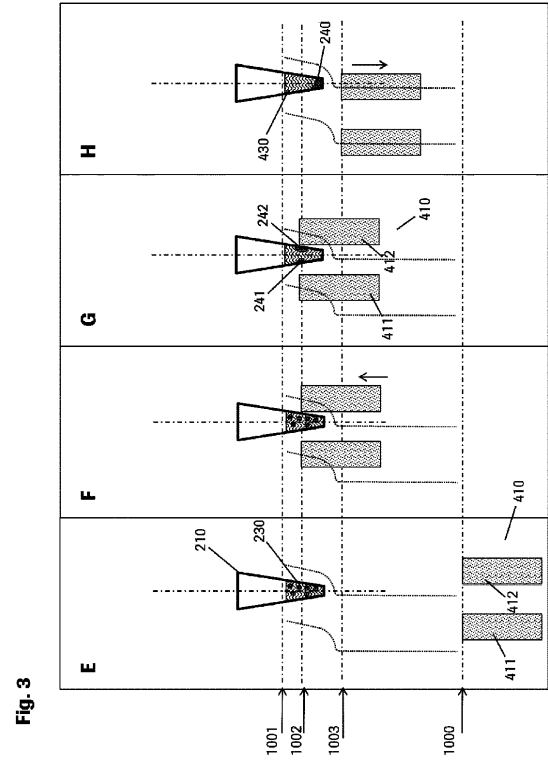


Fig. 3

【 図 3 - 2 】

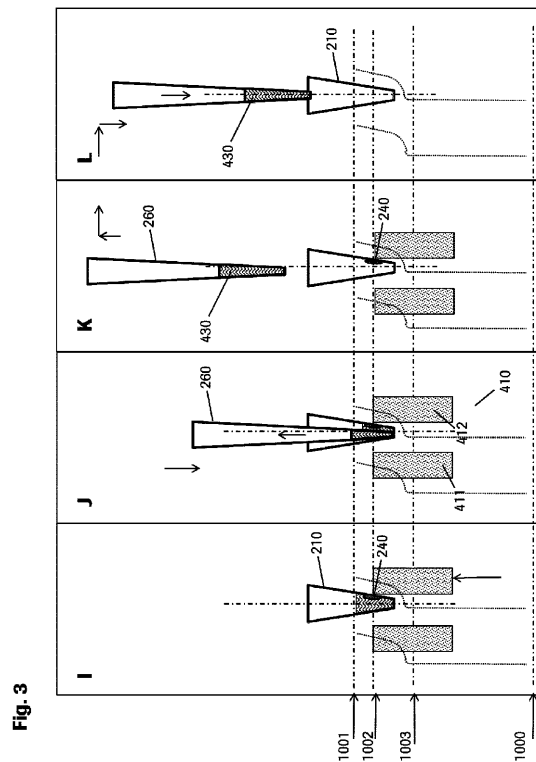


Fig. 3

【 図 4 A 】

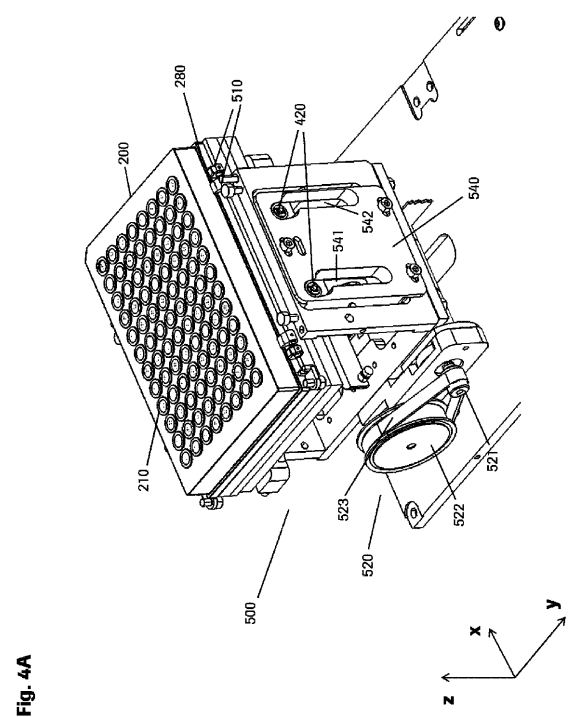


Fig. 4A

【 図 4 B 】

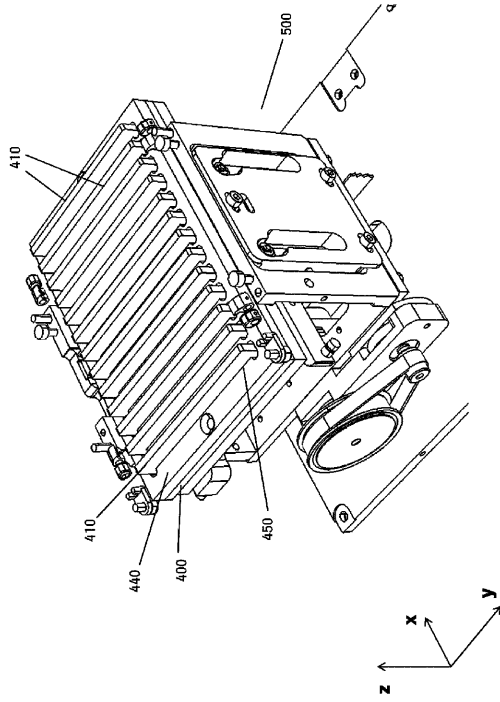


Fig. 4B

【 図 4 C 】

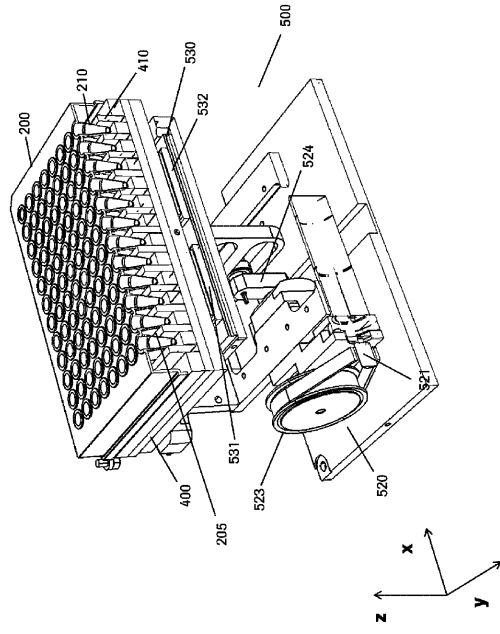


Fig. 4C

【 図 4 D 】

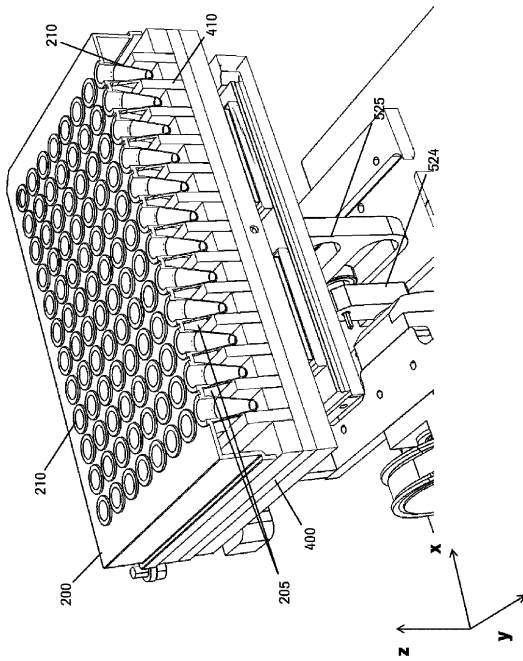


Fig. 4D

【 図 4 E 】

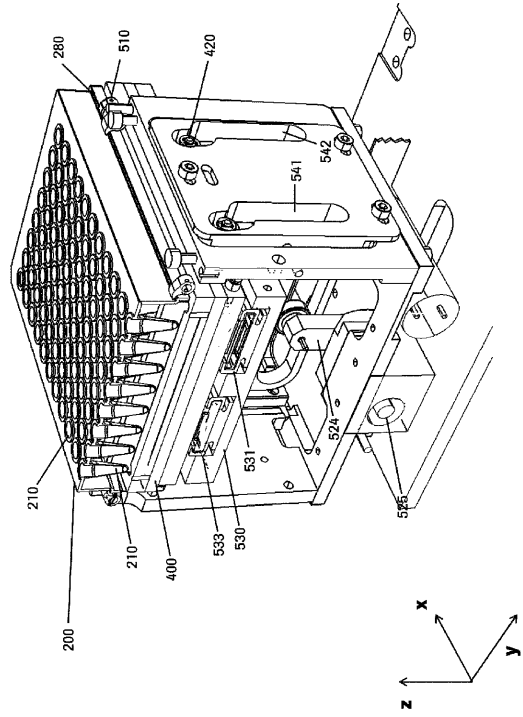
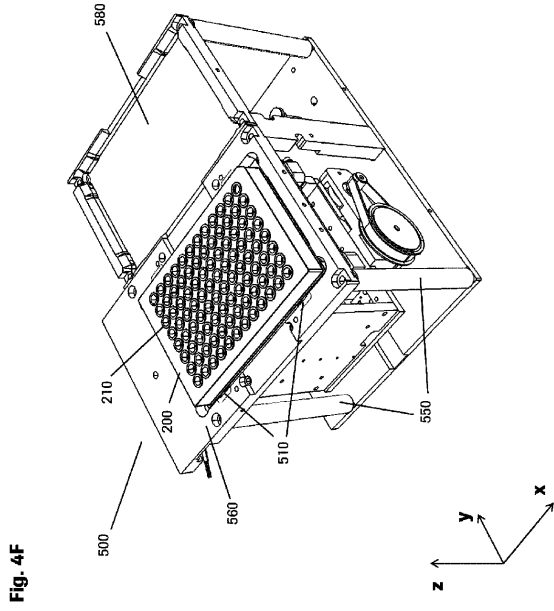
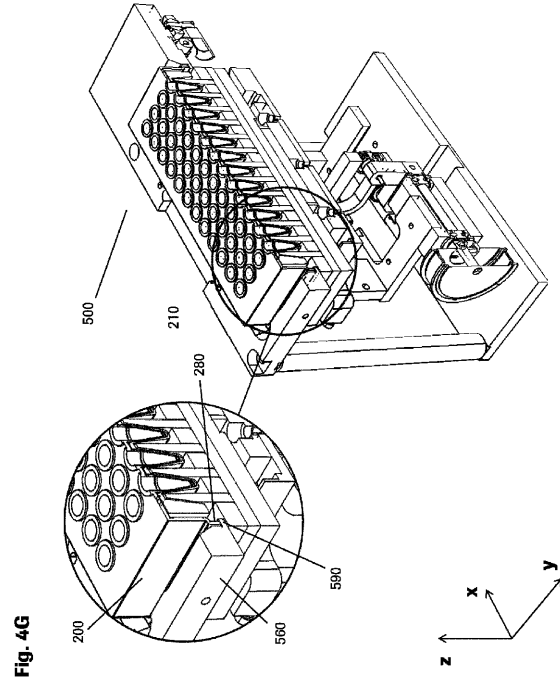


Fig. 4E

【 図 4 F 】



【 図 4 G 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2018/077376

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. B01L3/00 B01L9/00 G01N35/00 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) B01L G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A X A	US 2011/300620 A1 (BELZ RENATO [CH] ET AL) 8 December 2011 (2011-12-08) paragraphs [0042] - [0091], [0167] - [0171], [0204] - [0211], [0218] - [0225], [0328]; figures 39-43a-c ----- US 2002/008053 A1 (HANSEN TIMOTHY R [US] ET AL) 24 January 2002 (2002-01-24) paragraphs [0012], [0031] - [0046]; figures 1-12 ----- AU 2011 202 810 A1 (BIOMERIEUX BV) 30 June 2011 (2011-06-30) page 7, line 28 - page 20, line 26; claims 1-17; figures 5-20 ----- ----- -/--	9-12 1-8 1-9, 11, 12 1-12
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 12 November 2018		Date of mailing of the international search report 19/11/2018
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Ruiz-Echarri Rueda

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2018/077376

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 1 955 079 B1 (QIAGEN NORTH AMERICAN HOLDINGS [US]; QUINN TIM [US]) 18 August 2010 (2010-08-18) paragraphs [0076], [0108] - [0115]; figures 1-7A-B -----	1,4,9
A	US 2012/269702 A1 (SAFAR SCOTT G [US] ET AL) 25 October 2012 (2012-10-25) paragraphs [0209] - [0234]; figures 1-3(A-B), 40C, 44-48 -----	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2018/077376

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2011300620	A1	08-12-2011	EP 2338596 A1 29-06-2011
			JP 6049235 B2 21-12-2016
			JP 2011123065 A 23-06-2011
			US 2011300620 A1 08-12-2011

US 2002008053	A1	24-01-2002	AT 419919 T 15-01-2009
			EP 1282469 A2 12-02-2003
			ES 2319101 T3 04-05-2009
			JP 4792192 B2 12-10-2011
			JP 2004515333 A 27-05-2004
			US 2002008053 A1 24-01-2002
			WO 0189705 A2 29-11-2001

AU 2011202810	A1	30-06-2011	NONE

EP 1955079	B1	18-08-2010	AT 478342 T 15-09-2010
			EP 1955079 A2 13-08-2008
			JP 2009512445 A 26-03-2009
			US 2007092403 A1 26-04-2007
			US 2012058011 A1 08-03-2012
			WO 2007050327 A2 03-05-2007

US 2012269702	A1	25-10-2012	CA 2483445 A1 06-11-2003
			EP 1499415 A1 26-01-2005
			EP 2500076 A2 19-09-2012
			JP 5066553 B2 07-11-2012
			JP 5759411 B2 05-08-2015
			JP 2005523692 A 11-08-2005
			JP 2009229470 A 08-10-2009
			JP 2012137501 A 19-07-2012
			US 2006081539 A1 20-04-2006
			US 2010227387 A1 09-09-2010
			US 2012269702 A1 25-10-2012
			WO 03090897 A1 06-11-2003

フロントページの続き

(81) 指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(72) 発明者 コーナー, シュテファン
 スイス国 6 3 4 3 ロートクロイツ, フォルレンシュトラッセ 2, ロシュ ダイアグノスティックス インターナツィオナル アクチェンゲゼルシャフト

(72) 発明者 サロフィム, エマド
 スイス国 6 3 4 3 ロートクロイツ, フォルレンシュトラッセ 2, ロシュ ダイアグノスティックス インターナツィオナル アクチェンゲゼルシャフト

(72) 発明者 サバティック, ゴラン
 スイス国 6 3 4 3 ロートクロイツ, フォルレンシュトラッセ 2, ロシュ ダイアグノスティックス インターナツィオナル アクチェンゲゼルシャフト

(72) 発明者 シミク, マルコ
 スイス国 6 3 4 3 ロートクロイツ, フォルレンシュトラッセ 2, ロシュ ダイアグノスティックス インターナツィオナル アクチェンゲゼルシャフト

Fターム(参考) 2G058 CC02 ED02 ED19 ED35

4B029 AA09 AA21 AA23 BB20 CC01 DG08 FA10 HA07 HA09